

有機分子構造解析技術に関する調査研究報告

浅川大樹*

(平成 27 年 12 月 28 日受理)

Survey on Structure Analysis of Organic Compounds

Daiki ASAKAWA

Abstract

X-ray diffraction (XRD) analysis, nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and mass spectrometry (MS) are widely used to determine the molecular structure of organic compounds. This survey focuses first on the aspect for each analytical method, followed by introduction of the recent development for the XRD, NMR and MS. Additionally, future prospects of these methods are discussed.

1. はじめに

科学技術の進歩に伴い、多種多様な機能を有する有機化合物が合成され、今日の豊かな暮らしはこれらの有機化合物によって成り立っているといても過言ではない。また、我々のからだは核酸からタンパク質や代謝物が合成され、これら様々な有機化合物の相互作用により、複雑な生命活動が維持されている。このように生体は多種多様な生理活性を持つ有機化合物を合成しており、これを研究することによって、医薬品の候補化合物などが見つけられている。これだけ有機合成化学が発展した現代においても、生体由来の有機化合物の全合成を達成することは未だに困難であり、生物が合成する有機化合物を研究することは非常に重要なトピックである。このように、新規な有機化合物の評価、そして生命機能の理解には、化合物の構造決定が必要である。しかしながら、この構造決定が有機化学・生命科学研究におけるボトルネックとなっており、研究対象としている分子を同定するために莫大な時間を要しているのが現状である。

有機化合物の構造決定には主に、質量分析法 (Mass Spectrometry; MS)¹⁾、X線回折法 (X-ray diffraction;

XRD)²⁾、核磁気共鳴法 (Nuclear Magnetic Resonance; NMR)³⁾が主に用いられており、それぞれの分析法において、分析対象の試料および得られる情報が異なる。従って、効率的に有機化合物の構造解析を行うためには自分の分析対象に適した分析法を選択することが重要である。本調査研究では、新規 MS 技術の開発を行うにあたり、競合技術である XRD や NMR との比較を行い、MS 技術開発に求められる方向性を調査した。さらにそれぞれ技術の最近の研究報告から有機化合物構造解析技術の将来についての考察を行った。

2. XRD, NMR, MS の特徴

上記のように、有機化合物の構造解析手法として、主に XRD, NMR, MS が用いられる。これらの分析技術は、表 1 に示したように適用できる試料と得られる情報が異なる。簡単に特徴を述べると、XRD は有機化合物の結晶に X 線を照射しその回折像から構造解析を行うため、試料は「結晶」でなければならない。有機化合物を結晶化させるためにはミリグラム程度の単離した試料が必要である。これに加え、結晶化に最適な濃度、温度などの条件は、個々の試料によって異なる。この結晶化というステップが XRD で構造解析を行う上でのボトルネックとなっている。その一方で、この XRD は光学異性体を

*分析計測標準研究部門ナノ顕微計測研究グループ

含む有機化合物の構造情報を得ることができるという他の分析法には無い利点を有している。生体に含まれるタンパク質の大部分がL-アミノ酸から構成されているように、有機化合物の光学異性体はそれぞれ異なる生理活性を示すため、生体分子の絶対配置の決定はきわめて重要である。従って、有機化合物の構造解析におけるXRDのニーズは非常に大きい。

一方、NMRは外部磁場中に置かれたスピンを持つ原子核が固有の周波数の電磁波に共鳴する現象を利用した分析法である。NMRによる有機化合物の構造解析では主に¹Hを対象に分析を行い、試料分子の化学式を決定することができる。このNMRによる分析では、試料の有機化合物を単離する必要があるため、比較的単離が容易な有機合成などの分野では主要な分析法として用いられている。

最後にMSの特徴は、XRD、NMRに比べ非常に高感度に試料分子の分析が可能である。さらに、混合物試料でも分析可能であるという利点を持つが、その一方で得られる情報は分子の質量のみであり、質量分析のみで構造決定を行うことは難しい。多くの場合、タンデム質量分析による有機化合物のフラグメンテーション情報を取得し、これをデータベースや類似の標準試料と比較することで構造決定が行われている。このように、有機化合物の分析において、XRD、NMR、MSはそれぞれ異なった特徴を有しており、分析対象試料の状態によって適した分析法を選択する必要がある。

3. XRDの最近の研究報告と展望

上記のように、XRDは有機化合物の構造解析において最も信頼できる手法であるが、試料分子の結晶化のプロセスがボトルネックとなっている。この結晶化を行うことなく、有機化合物のXRDを行う手法、「スポンジ結晶法」が2013年に発表された⁴⁾。この手法は、スポンジ結晶と呼ばれるコバルトや亜鉛などを核とする金属錯体多孔性結晶に分析対象試料溶液を浸すことで、有機化合物がスポンジ結晶の空孔内に規則的に配列するという

現象を利用する。その後、この試料分子を含むスポンジ結晶にX線を照射することで、スポンジ結晶に包摂された試料分子の回折像を得ることができる。このスポンジ結晶法の最大の利点は、上記のように有機物試料の結晶化を必要としない点である。これまで有機化合物の結晶を得るためにはミリグラム単位の単離された試料分子が必要であったが、本手法ではスポンジ結晶に試料分子を包摂するため、マイクログラム程度の試料でも回折像を得ることができると報告されている。これに加えて、有機化合物の光学異性の決定も容易になると考えられる。現在、光学異性体の決定を行うためには、重元素によるX線の散乱を計測する必要があるが、分析上の工夫が必要である。例えばイオン性の官能基を有する有機化合物が測定対象である場合は、遷移金属などの重元素を含む塩として結晶化させ、測定を行う。また、タンパク質の場合はメチオニン残基の硫黄原子をセレン原子に置換したセレノメチオニンをタンパク質試料分子に導入し、セレン原子によるX線の異常散乱を用いるなどの方法が用いられる⁵⁾。一方、スポンジ結晶法ではスポンジ結晶がコバルトや亜鉛などの重原子を含んでいるため、内包された有機化合物の光学異性体を区別することが可能となる⁴⁾。多くの生体由来の有機化合物は不斉炭素原子を含み、それぞれの光学異性体で異なる生理活性を有するため、医薬品などの開発では光学異性を正確に決定する必要があるが、この分析に莫大な時間を要している。また人体にふくまれるアミノ酸のほとんどはL体であるが、近年の研究によるとDアミノ酸も微量に存在し、アルツハイマー病や統合失調症、筋萎縮性側索硬化症など、さまざまな疾患のバイオマーカーとなっていることが明らかにされている。この例から推測すると、アミノ酸以外の多くの代謝物において、生体に微量に存在する鏡像体が疾患バイオマーカーとなっていることが予想される。本手法の発展により、光学異性体の分析も容易に行えるようになると期待される。以上に述べたように、このスポンジ結晶法は非常に重要な分析手法となることが期待され、本手法の発展により、X線結晶構造解析の適用範囲は大幅に拡大することが見込まれる。

表1 XRD, NMR, MSの特徴

	分析対象	得られる情報
XRD	試料の結晶	有機分子の三次元構造
NMR	ミリグラム程度の試料（純度95%程度）	有機分子の化学式
MS	マイクログラム以下の試料（混合物も可）	有機分子の質量

4. NMR の最近の研究報告と展望

NMRは有機合成分野などで広く用いられている分析法であり、生体由来の試料についても糖鎖の結合様式の決定やタンパク質の立体構造の解析などに使われている。最近ではNMIJの有機化合物の純度の二次標準として研究が進められている手法でもある⁶⁾。NMRでは有機化合物の結合情報が得られるため、結晶化しにくくXRDでの分析が困難な試料に有効な分析手法である。一方、欠点としては試料中に含まれるスピンの持つ原子核のシグナル全てが検出されるため、試料が混合物である場合、正確な同定が困難であることで、分析を行う前に分析対象化合物を単離する必要がある。また、タンパク質や糖鎖など複雑な有機化合物の構造を推定するためには、¹Hだけではなく核スピンを持つ炭素原子の同位体¹³CのNMRスペクトルを取得することが必要である。¹³Cは天然に1.1%しか存在していないため、十分なS/Nでシグナルを検出するためには、¹Hに比べ100倍の試料量が必要とし、生体成分の微量有機化合物の分析は難しいのが現状である。この一方で、細胞内でのタンパク質の動態を調べるために¹³Cと¹⁵Nで構成された合成タンパク質を細胞に導入し、直接NMRで分析するという研究も報告されている⁷⁾。これは、天然存在比の高い¹²Cと¹⁴NがNMRではシグナルを与えないというNMRの欠点を利用したユニークな研究である。¹³Cと¹⁵Nの天然存在比はそれぞれ1.1%、0.37%であるため、この細胞から検出される¹³Cと¹⁵N由来のシグナルの大部分は目的の合成タンパク質由来である。この手法は細胞というきわめて複雑な混合物の中に存在する目的のタンパク質分子を選択的な検出を可能とし、生きた細胞の中のタンパク質の振る舞いを明らかにした重要な報告である⁷⁾。

NMRの今後の展望について考察すると、自然科学において非常に重要な分析法ある一方で、超伝導磁石の使用などにより、装置は大型のものに限られるというデメリットを有する。

5. MS の最近の研究報告

MSは気相イオンと電磁場の相互作用により、質量を計測する手法である。従来、MSは揮発性有機化合物が測定対象であったが、エレクトロスプレー (electrospray ionization; ESI)⁸⁾やマトリックス支援レーザー脱離イオン化 (matrix-assisted laser desorption/ionization; MALDI)⁹⁾に代表される試料イオンを分解させず気相イ

オンを生成させる「ソフトイオン化法」の開発により、生体分子などの不揮発性有機化合物の分子量測定が可能となった。これらのソフトイオン化法の普及により、MSの適用範囲は生体分子の計測にまで広がり、特に創薬における薬物動態研究に欠かせない技術となっている。MSでは、測定対象の化合物の質量を測定するため、最適条件では一つの化合物が一つのシグナルを与える。従って、一つの化合物が複数のシグナルを与えるXRDやNMRでは分析の難しい、混合物試料の分析についても適用可能である。また、新しい応用として、小型MS装置による簡易分析がある。現在、最小のMS装置は装置重量10kg程度であり、近い将来、持ち運び可能で現場での分析にも対応できる小型MS装置の活躍が見込まれる¹⁰⁻¹²⁾。超伝導磁石を必要とするNMRや大型の光源を用いるXRDに対して、MSでの分析に必要なものは真空環境のみであることに起因する利点である。

図1のようにMSは測定対象の有機化合物を単離することなく、混合物のままでも分析可能な優れた手法であるが、その一方で、得られる情報は試料分子の「質量」のみであるという欠点を持つ。つまり、MSによる有機分子の測定結果から決定できるのは分析対象化合物の「組成式」である。有機化合物には、同一組成式を持つ性質の異なる異性体が多数存在するため、MSから得られる情報のみでは有機化合物の同定は不可能であり、この定性分析の能力の低さがMSの欠点である。この欠点を補うために、図1に示したように「タンデム質量分析計」が開発されている。この図1では、例として一般的に用いられることの多い1stMSに四重極型、2ndMSに飛行時間型の質量分析計を配置したタンデム質量分析装置を示した。このタンデム質量分析法では、まず混合物試料をイオン源 (Ion source) に導入し、上記のソフトイオン化法によりイオン化、気相の試料イオンを生成する。このイオンは作動排気により質量分析計の中に導入され、四重極マスフィルター (1stMS) によって、目的の質量電荷比のイオンが選別される。この試料イオンのみを「Collision Cell」へと導入し、分解 (フラグメンテーション) させる。これにより生成したフラグメントイオンの質量を2ndMS (飛行時間型質量分析計) により計測するという手順で分析が行われる。飛行時間型質量分析計で検出されたフラグメントイオンは、試料分子の一部分の構造を含んでいるため、このフラグメントイオンの質量から試料分子の構造を推定することが可能となる。しかしながら、実際にはタンデム質量分析の結果から試料分子の構造を決定できることは稀であり、試料イオンの質量と、タンデム質量分析で得られたフラグメン

トイオンの質量情報から候補化合物をピックアップし、データベースや類似の標準試料と比較することで有機化合物の同定を行うケースが多い。

このようにタンデム質量分析の開発により、MSによる構造解析技術は大きな進歩を遂げたが、同定能力はNMR, XRDと比較すると低いというのが現状である。タンデム質量分析による有機化合物の同定能力向上が必要とされるなかで、近年様々な分解（フラグメンテーション）手法が開発されている。新規フラグメンテーション手法の中で、著者が注目している方法は、ラジカル化を伴うフラグメンテーションである。有機化合物が

ラジカル化すると、ラジカルサイトの隣の結合が選択的に切断されることは良く知られた現象である。図2にタンパク質の例を示すが、タンパク質に水素付加を行い水素過剰ラジカルとなった場合はN-C α 結合が選択的に切断される一方、水素引抜によって水素欠乏ラジカルとなった場合は、C α -C結合の切断が起こる。つまり、ラジカル化のサイトを操作することで、特定の結合の切断が可能となり、分析化学者が知りたい構造情報を得ることができるようになることが期待される。このように未知の有機化合物試料の同定を可能とするタンデム質量分析技術の開発が次の自然科学のブレイクスルーを導くと

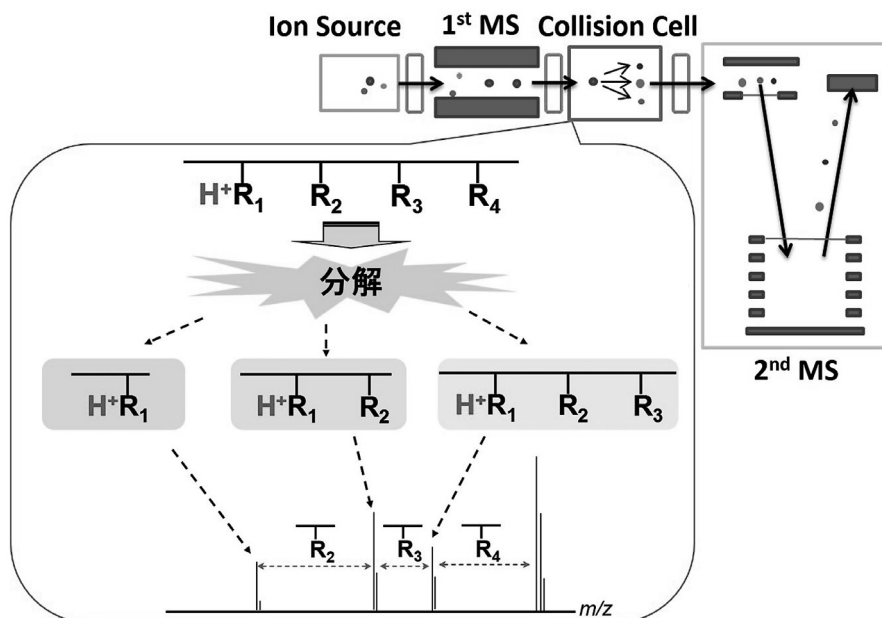


図1 タンデム質量分析法 (MS/MS) の概要

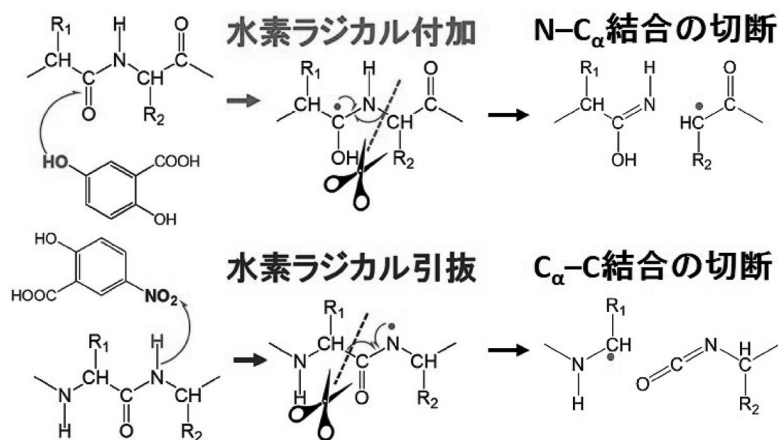


図2 タンパク質のラジカル化に伴うフラグメンテーション

筆者は展望している。

6. まとめ

本調査研究では有機化合物の構造解析に主に用いられる、XRD、NMR、MS について最近の研究動向と今後の展望について考察を行った。まず X 線結晶構造解析は最も信頼できる手法であるが、試料の結晶化がボトルネックであったが、スポンジ結晶法の開発により、結晶化しない試料の測定が可能となり、用途の拡大が見込まれる。さらにこの手法により生体分子の光学異性体の同定も容易になると考えられる。一方、NMR は現在有機化合物の構造解析で中心的な役割を担っているが、装置が大型であり、応用範囲は大きくは広がらないであろうと推測される。MS は混合物の測定が可能であるという大きな利点を持つ分析法である。近年の研究開発により、測定の簡便化や装置の小型化が進んでおり、今後様々な応用に用いられると期待されている。一方で、MS で得られる情報は分子量情報であり XRD、NMR に比べ有機化合物の同定能力が低いことが欠点である。MS でより正確に有機化合物の構造解析を行うために、タンデム質量分析法を用いた研究が行われている。特に注目されている研究としては、選択的な化学結合解裂を可能とするラジカル化を伴うフラグメンテーションである。これらの基礎研究から、MS/MS の革新的新規技術が開発され、有機化合物を単離することなく同定が可能となれば自然科学分野にブレイクスルーをもたらすと考えられる。これが次世代の分析化学に求められる技術であると著者は展望する。

参考文献

- 1) Thomson, J. J., Rays Of Positive Electricity and Their Application to Chemical Analysis. London: Longman's Green and Company 1913.
- 2) Dickinson, R. G.; Raymond, A. L., The Crystal Structure of Hexamethylene-Tetramine. *J. Am. Chem. Soc.* 1923, 45, 22-29.
- 3) Rabi, I. I.; Zacharias, J. R.; Millman, S.; Kusch, P., A New Method of Measuring Nuclear Magnetic Moment. *Phys. Rev.* 1938, 53, 318-327.
- 4) Inokuma, Y.; Yoshioka, S.; Ariyoshi, J.; Arai, T.; Hitora, Y.; Takada, K.; Matsunaga, S.; Rissanen, K.; Fujita, M., X-ray analysis on the nanogram to microgram scale using porous complexes. *Nature* 2013, 495, 461-466.
- 5) Hendrickson, W. A.; Horton, J. R.; LeMaster, D. M., Selenomethionyl proteins produced for analysis by multiwavelength anomalous diffraction (MAD): A vehicle for direct determination of three-dimensional structure. *EMBO J.* 1990, 9, 1665-1672.
- 6) 斎藤直樹, 核磁気共鳴 (NMR) 分光法による有機化合物の定量分析法に関する調査研究. 計量標準報告 2014, 9, 117-134.
- 7) Sakakibara, D.; Sasaki, A.; Ikeya, T.; Hamatsu, J.; Hanashima, T.; Mishima, M.; Yoshimasu, M.; Hayashi, N.; Mikawa, T.; Wälchli, M.; Smith, B. O.; Shirakawa, M., et al., Protein structure determination in living cells by in-cell NMR spectroscopy. *Nature* 2009, 102-105.
- 8) Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M., Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. *Science* 1989, 246, 64-71.
- 9) Karas, M.; Hillenkamp, F., Laser Desorption Ionization of Protein with Molecular Masses Exceeding 10,000 Daltons. *Anal. Chem.* 1988, 60, 2299-2301.
- 10) Ouyang, Z.; Noll, R. J.; Cooks, R. G., Handheld Miniature Ion Trap Mass Spectrometers. *Anal. Chem.* 2009, 81, 2421-2425.
- 11) Li, L.; Chen, T. C.; Ren, Y.; Hendricks, P. I.; Cooks, R. G.; Ouyang, Z., Mini 12, Miniature Mass Spectrometer for Clinical and Other Applications - Introduction and Characterization. *Anal. Chem.* 2014.
- 12) Snyder, D. T.; Pulliam, C. J.; Ouyang, Z.; Cooks, R. G., Miniature and Fieldable Mass Spectrometers: Recent Advances. *Anal. Chem.* 2016, in press.